


**POLYOXYALKYLENE DERIVATIVE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME**

**Patent number:** JP2003113241  
**Publication date:** 2003-04-18  
**Inventor:** SAKAGAMI KENJI; KUBO KAZUHIRO; OHASHI SHUNSUKE; ITOU TOMOYOSHI  
**Applicant:** NOF CORP  
**Classification:**  
 - international: C08G65/333; A61K47/48  
 - european:  
**Application number:** JP20020220091 20020729  
**Priority number(s):**

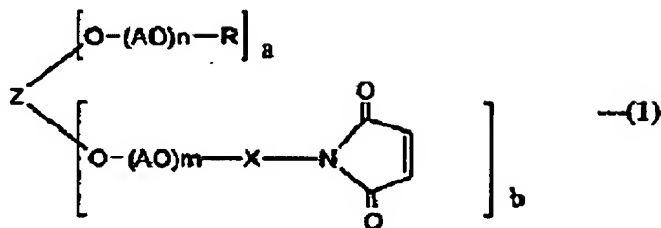
Also published as:

 JP2003113241 (A)

### Abstract of JP2003113241

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for producing a safe and high-purity polyoxyalkylene derivative to be used in modifying biologically related substances of high preservability.

**SOLUTION:** The objective polyoxyalkylene derivative is shown by the formula (1) (where, Z is the residue of a compound having 2-8 hydroxy groups; AO is a 2-18C oxyalkylene group; n is 0-2,000; m is 0-2,000;  $1 \leq n+m$ ,  $2 \leq a+b \leq 8$ ,  $1 \leq b$ ; R is a 1-30C hydrocarbon group; and X is a 3-10C bivalent hydrocarbon group). The other objective method for producing the polyoxyalkylene derivative is provided.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-113241  
(P2003-113241A)

(43) 公開日 平成15年4月18日 (2003. 4. 18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 0 8 G 65/333		C 0 8 G 65/333	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48		A 6 1 K 47/48	4 J 0 0 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2002-220091 (P2002-220091)

(22) 出願日 平成14年7月29日 (2002. 7. 29)

(31) 優先権主張番号 特願2001-232045 (P2001-232045)

(32) 優先日 平成13年7月31日 (2001. 7. 31)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004341  
日本油脂株式会社  
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 坂上 研二  
神奈川県川崎市川崎区藤崎2-3-9

(72) 発明者 久保 和弘  
神奈川県川崎市高津区千年876-301

(72) 発明者 大橋 俊輔  
神奈川県川崎市川崎区藤崎2-3-9

(72) 発明者 伊藤 智佳  
神奈川県川崎市幸区東古市場103-203

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC29 EE59 FF68  
4J005 AA04 BD05

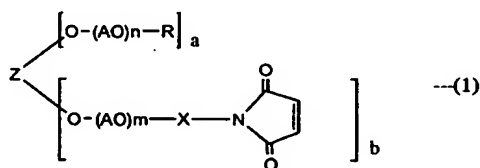
(54) 【発明の名称】 ポリオキシアルキレン誘導体およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 高純度であり、保存安定性に優れた生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体および安全で高純度のポリオキシアルキレン誘導体を得る製造方法を提供する。

【解決手段】 式 (1) で示されるポリオキシアルキレン誘導体およびその製造方法。

【化1】



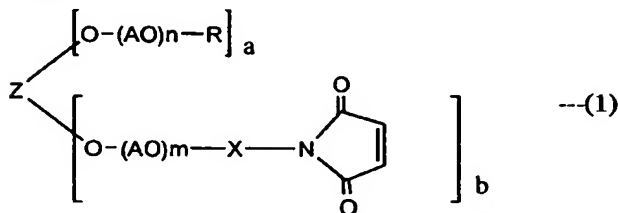
(式中、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基、Xは炭素数3～10の2価の炭化水素基を示す。)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体。

## 【化1】

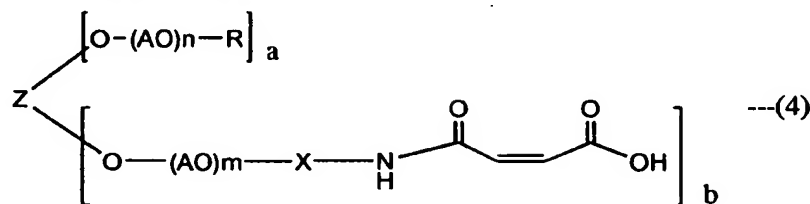


(式中、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基、Xは炭素数3～10の2価の炭化水素基を示す。)

【請求項2】GPC純度が90%以上およびマレイミド基導入率が90%以上である請求項1記載のポリオキシアルキレン誘導体。

【請求項3】pH7、23℃での加水分解安定性試験において、マレイミド基導入率の半減期(50%減衰時間)が48時間以上である請求項1または請求項2記載のポリオキシアルキレン誘導体。

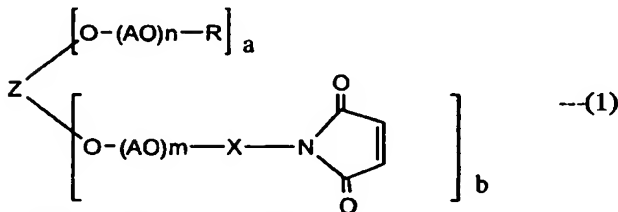
【請求項4】式(1)において、Zが3～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、 $3 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ である請求項1、請求項2または請求項3記載のポリオキ



(記号は前記と同じである。)を得た後、式(4)で示される化合物を式(4)で示される化合物に対し50～500容量/重量%の有機溶媒で溶解し、ついで式

(4)で示される化合物に対し300～5000容量/重量%の酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物を用いて晶析を行った後にマレイミド化反応を行う、式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体の製造方法。

## 【化4】



(記号は前記と同じである。)

【請求項8】式(2)で示される末端水酸基含有ポリオキシアルキレン誘導体

## 【化5】

2

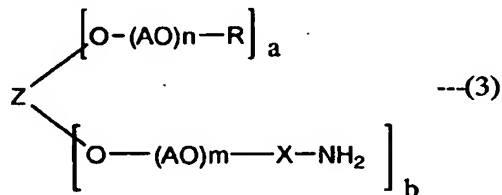
シアルキレン誘導体。

【請求項5】生体関連物質の修飾に用いることを特徴とする請求項1、請求項2、請求項3または請求項4記載のポリオキシアルキレン誘導体。

【請求項6】式(1)において、Xが炭素数3の2価の炭化水素基である請求項1、請求項2、請求項3、請求項4または請求項5記載のポリオキシアルキレン誘導体。

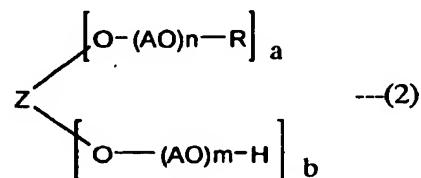
10 【請求項7】式(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体

## 【化2】



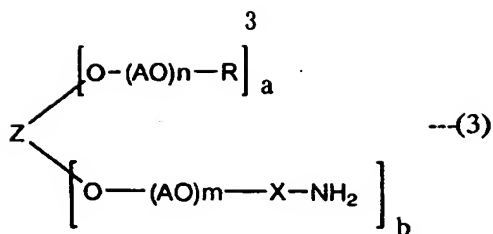
(式中、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基、Xは炭素数3～10の2価の炭化水素基を示す。)と無水マレイン酸を反応させて式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレイミド酸

## 【化3】



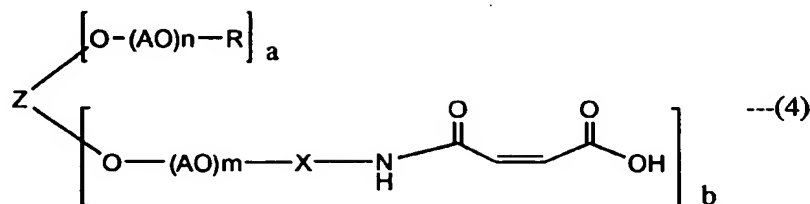
40 (式中、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基を示す。)をシアノ化し、水素化により末端をアミノ化した式(3)で示される末端アミノ基ポリオキシアルキレン誘導体

## 【化6】



\* (Xは炭素数3～10の2価の炭化水素基を示し、他の記号は前記と同じである。)と無水マレイン酸を反応させて式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレアミド酸

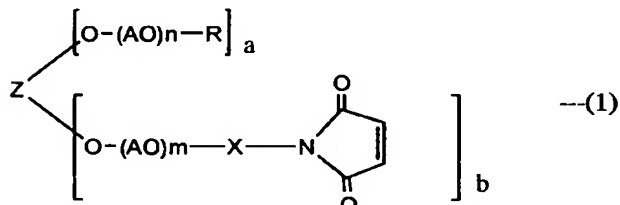
【化7】



(記号は前記と同じである。)を得た後、式(4)で示される化合物を式(4)で示される化合物に対し50～500容量/重量%の有機溶媒で溶解し、ついで式

(4)で示される化合物に対し300～5000容量/重量%の酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物を用いて晶析を行った後にマレイミド化反応を行う、式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体の製造方法。

【化8】



(記号は前記と同じである。)

【請求項9】無水マレイン酸の含有量が0.5重量%以下である式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレアミド酸を用いる請求項7または請求項8記載のポリオキシアルキレン誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリオキシアルキレン誘導体およびその製造方法に関する。さらに詳しくは、ポリペプチド、生理活性タンパク質、酵素などへの修飾やリポソーム、ポリマーミセルなどの薬物送達システム(以下DDSという)における修飾など、生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、DDSの重要な担体として末端変性ポリオキシアルキレン化合物が注目されている。特にポリペプチド、生理活性タンパク質、酵素などへのポリオキシアルキレン化合物による修飾やリポソーム、ポリマーミセルなどのポリオキシアルキレン化合物による修飾は抗原性(免疫反応性)の低減、薬剤の安定性増加、体内滞留時間の延長などの効果を得ることができる。末端変性ポリオキシアルキレン化合物としては、ペプチドやタンパク質の側鎖官能基、例えばリジン残基のアミノ

基、アスパラギン酸、グルタミン酸残基のカルボキシル基、システイン残基のチオール基、またはリン脂質、ポリマーミセル原料のアミノ基やカルボキシル基などと反応するカルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、チオール基、マレイミド基などの官能基が導入されている。これらの中で、システイン残基の側鎖チオール基やリジン残基に導入されたチオール基などに対して、マレイミド基を有する末端変性ポリオキシアルキレン化合物による修飾はチオエーテル結合を形成することから他の修飾法による結合よりもより強固な結合となりうる。しかし、従来、マレイミド基を有するポリオキシアルキレン化合物による修飾にはポリエチレングリコールまたはメトキシポリエチレングリコールに6-マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシコハク酸イミドなどを反応させたものが使用されていた。これらはポリオキシアルキレン鎖とマレイミド基の間にエステル結合を介しているため、生体内で加水分解し易いといった問題点があった。

【0003】また、国際公開92/16221パンフレット、国際公開98/3887パンフレット、特開2000-191700号公報、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97(15), 8548-53(2000)およびBiochem. J., 351(1), 87-93(2000)に記載されているα-マレイミドエチルオキシω-メトキシ(ポリオキシアルキレン)は、同様に保存安定性が低いといった問題点があった。また、医薬用途で使用される末端変性ポリオキシアルキレン化合物については、医薬製剤として展開していくには目的の化合物より高分子量の不純物などが少なく、活性基の導入率が高いものでなければならず、これらの純度や活性基の導入率に関してより高いものが要求されている。

【0004】従来、末端にマレイミド基を有するポリオキシアルキレン誘導体は、ポリオキシアルキレン鎖とマレイミド基の間に炭素数2のアルキル基をもつポリオキシアルキレン誘導体の製造方法がSynthetic communications, 22(16), 2425-29(1992)に記載されているが、中間体の精製方法について低引火点物質であるジエチルエーテルを

20

30

40

50

多量に使用しており、工業生産を行うには適当な方法ではなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、高純度であり、保存安定性に優れた生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体および安全で高純度のポリオキシアルキレン誘導体を得る製造方法を提供することを目的とする。

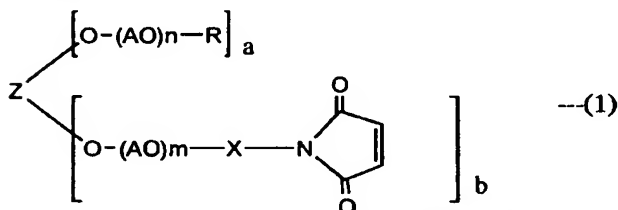
【0006】

【問題を解決するための手段】本発明は、(1)式

(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体、

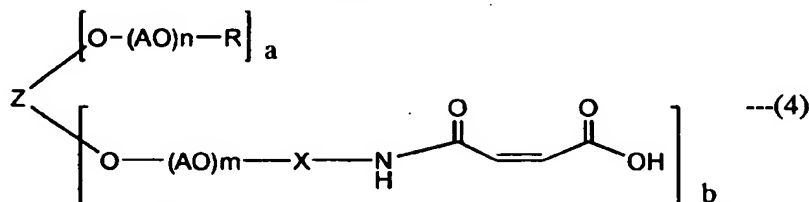
【0007】

【化9】



【0008】(式中、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基、Xは炭素数3～10の2価の炭化水素基を示す。)

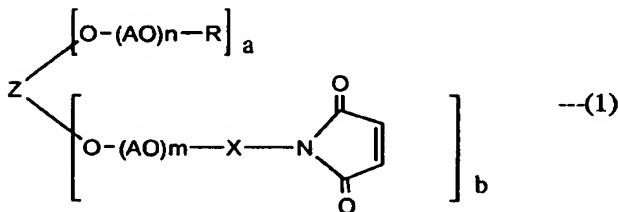
(2) GPC純度が90%以上およびマレイミド基導入率が90%以上である前記のポリオキシアルキレン誘導体、(3) pH7、23℃での加水分解安定性試験



【0012】(記号は前記と同じである。)を得た後、式(4)で示される化合物を式(4)で示される化合物に対し50～500容量/重量%の有機溶媒で溶解し、ついで式(4)で示される化合物に対し300～500容量/重量%の酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物を用いて晶析を行った後にマレイミド化反応を行う、式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体の製造方法、

【0013】

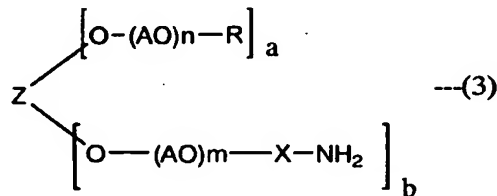
【化12】



において、マレイミド基導入率の半減期(50%減衰時間)が48時間以上である前記のポリオキシアルキレン誘導体、(4)式(1)において、Zが3～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、 $3 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ である前記のポリオキシアルキレン誘導体、(5)生体関連物質の修飾に用いることを特徴とする前記のポリオキシアルキレン誘導体、(6)式(1)において、Xが炭素数3の2価の炭化水素基である前記のポリオキシアルキレン誘導体、(7)式(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体

【0009】

【化10】



【0010】(式中、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基、Xは炭素数3～10の2価の炭化水素基を示す。)と無水マレイン酸を反応させて式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレイアミド酸

【0011】

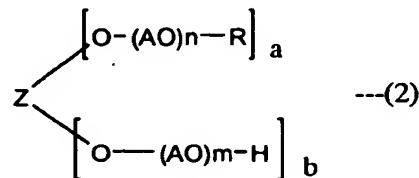
【化11】

【0014】(記号は前記と同じである。)

(8)式(2)で示される末端水酸基含有ポリオキシアルキレン誘導体

【0015】

【化13】

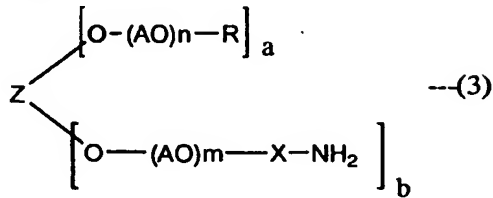


【0016】(上記式において、Zは2～8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、AOは炭素数2～18のオキシアルキレン基、nは0～2000、mは0～2000、 $1 \leq n+m$ 、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ であり、Rは炭素数1～30の炭化水素基を示す。)をシアノ化し、

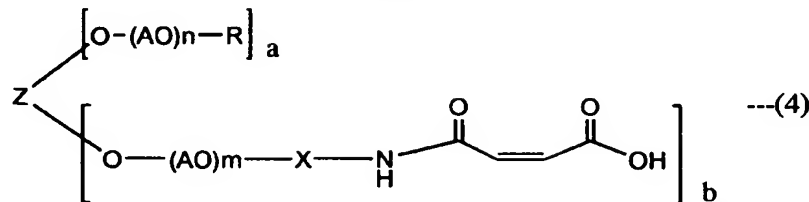
水素化により末端をアミノ化した式(3)で示される末端アミノ基ポリオキシアルキレン誘導体

【0017】

【化14】



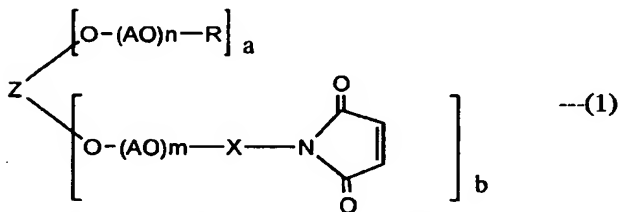
\*10



【0020】(記号は前記と同じである。)を得た後、式(4)で示される化合物を式(4)で示される化合物に対し50~500容量/重量%の有機溶媒で溶解し、ついで式(4)で示される化合物に対し300~500容量/重量%の酢酸エチルとn-ヘキサンを混合用いて晶析を行った後にマレイミド化反応を行う、生体関連物質の修飾に用いられる式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体の製造方法、

【0021】

【化16】



【0022】(記号は前記と同じである。)

(9) 無水マレイン酸の含有量が0.5重量%以下である式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレイミド酸を用いる前記のポリオキシアルキレン誘導体の製造方法である。

【0023】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳しく説明する。本発明のポリオキシアルキレン誘導体は、特に生体関連物質の修飾に有用な化合物である。生体関連物質とは、生体内において生命活動を維持していくために必要な物質およびそれに関連した物質のことである。例えば生理活性物質、構造タンパク質やリン脂質が挙げられ、アミノ酸を人工的に重合させたポリリジンやポリグルタミン酸などのポリアミノ酸も含まれる。生理活性物質としてはグルタチオンなどのチオール基を有するペプチド、ヘモグロビン、インシュリンなどの生理活性タンパク質、リパーゼ、プロテアーゼなどの酵素、化学的手法や遺伝子組み替えにより得られるペプチド、タンパク

\*【0018】(Xは炭素数3~10の2価の炭化水素基を示し、他の記号は前記と同じである。)と無水マレイン酸を反応させて式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレイミド酸

【0019】

【化15】

質、酵素などである。構造タンパク質としては生体組織を形成するコラーゲンやケラチンなどが挙げられる。

【0024】式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体について以下に詳細に述べる。Zは2~8個の水酸基をもつ化合物の残基であり、好ましくは3~8個の水酸基をもつ化合物の残基である。2~8個の水酸基をもつ化合物としてはエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ペンタエリスリトールなどが挙げられ、好ましくはエチレングリコール、グリセリン、ジグリセリン、ヘキサグリセリン、ペンタエリスリトールであり、より好ましくはグリセリン、ジグリセリン、ヘキサグリセリン、ペンタエリスリトールである。AOで示される炭素数2~18のオキシアルキレン基としては、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシブチレン基、オキシテトラメチレン基、オキシスチレン基、オキシドデシレン基、オキシテトラデシレン基、オキシヘキサデシレン基、オキシオクタデシレン基などが挙げられ、好ましくは炭素数2~4のオキシアルキレン基であり、より好ましくはオキシエチレン基である。

【0025】nおよびmは炭素数2~18のオキシアルキレン基の付加モル数を示しており、nおよびmはそれぞれ0~2000、 $1 \leq n+m$ の範囲である。nおよびmは好ましくはそれぞれ20~2000、より好ましくはそれぞれ40~1000の範囲である。また、 $20 \leq n+m \leq 1200$ の範囲が好ましく、より好ましくは $40 \leq n+m \leq 400$ の範囲である。aおよびbはポリオキシアルキレン鎖の本数を示しており、 $2 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ の範囲である。好ましくは $3 \leq a+b \leq 8$ 、 $1 \leq b$ の範囲である。生体関連物質は修飾することにより免疫系への取り込みを抑制することができるが、2本以上のポリオキシアルキレン鎖を有するポリオキシアルキレン誘導体により生理活性物質を修飾すること

で、活性を低下させずに修飾効果を得ることができる。また、2つ以上のマレイミド基を有するポリオキシアルキレン誘導体により生理活性物質を修飾すると、さらに分子量を増加させることができ、より免疫系への取り込みを抑制することができる。また、 $n$ 、 $m$ 、 $a$ および $b$ はポリオキシアルキレン誘導体の全体分子量を表す指標であり、これらの関係式は $1 \leq (n \times a + m \times b) \leq 16$ 、 $000$ の範囲であり、 $20 \leq (n \times a + m \times b) \leq 5$ 、 $000$ の範囲が好ましく、より好ましくは $40 \leq (n \times a + m \times b) \leq 1$ 、 $200$ の範囲である。これら

【0026】 $R$ で示される炭素数1~30の炭化水素基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、第三ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、2-エチルヘキシル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、イソトリデシル基、テトラデシル基、ヘキサデシル基、イソヘキサデシル基、オクタデシル基、イソオクタデシル基、オクタデセニル基、オクチルドデシル基、ドコシル基、デシルテトラデシル基等の脂肪族炭化水素基、ベンジル基、クレジル基、ブチルフェニル基、ジブチルフェニル基、オクチルフェニル基、ドデシルフェニル基、ジオクチルフェニル基、ジノニルフェニル基、ナフチル基、スチレン化フェニル基、4-メトキシベンジル基、トリフェニルメチル基等の芳香族炭化水素基等が挙げられ、好ましくはメチル基、エチル基、第三ブチル基、オクタデシル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、トリフェニルメチル基である。より好ましくはメチル基、第三ブチル基、ベンジル基である。 $X$ で示される炭素数3~10の2価の炭化水素基としては、例えばトリメチレン基、イソプロピレン基、テトラメチレン基、イソブチレン基、ジメチルメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基、ノナメチレン基、デカメチレン基などの直鎖および分岐炭化水素基、フェニルメチレン基などの芳香族炭化水素基が挙げられ、好ましくはトリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基、ノナメチレン基、デカメチレン基であり、より好ましくはトリメチレン基、またはヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基、ノナメチレン基、デカメチレン基である。水酸基を有する化合物に対して、シアノ基を導入する方法としてアクリロニトリルを付加させるシアノエチル化が純度および収率の面で優れている。シアノエチル化された化合物から得られるものは炭素数3の2価の炭化水素基を有する化合物である。このことから、式(1)において、 $X$ が

炭素数3の2価の炭化水素基であるものがより好ましい。一方、 $X$ において炭素数が6~10である2価の炭化水素基であるものについては、加水分解安定性がさらに優れたものになるため、生体関連物質を修飾して製剤を開発する際、同質性の優れた製剤を提供することが可能になることから、好ましい。

【0027】また、得られるポリオキシアルキレン誘導体の純度に関して、医薬製剤の原料として用いる場合には製剤の均質性や生体関連物質との反応性が要求されることからより高い純度が求められる。ポリオキシアルキレン誘導体においては、まず、製剤の均質性に関する問題からGPC純度が要求される。これは目的分子量の2倍量体、3倍量体などの含有量に関する純度である。本発明で得られる生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体は、GPC純度が好ましくは90%以上であり、より好ましくは95%以上である。

【0028】GPC純度は以下に記載の試験法において測定を行うことができる。

GPC純度の測定法：GPC（ゲルパーミエーションクロマトグラフィ）にて測定を行う。カラムはSHODEX KF804L（8mm I. D×30cm、昭和電工（株）製）を3本接続したものを使用し、溶離液はテトラヒドロフラン、流速1.0mL/分、カラム温度40℃、検出器に示差屈折計を用い、試料は0.1重量%濃度のテトラヒドロフラン溶液とし、注入量は100μLとする。得られたクロマトグラムにおいて、ピークが分離している場合はピーク間の極小値から垂直分割し、ピークが重なっている場合はピーク間の変曲点から垂直分割して、得られた各ピークの面積値からメインピークの面積百分率を算出する。

【0029】また、生体関連物質との十分な反応性を得るためには末端活性基であるマレイミド基の置換率が高いことが望まれる。末端活性基の置換率が不十分であると修飾された生体関連物質の生成率が低下し、血中滞留性が低下するなど製剤の性能低下につながる。本発明で得られる生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体は、ポリオキシアルキレン鎖末端官能基であるマレイミド基導入率が好ましくは90%以上であり、より好ましくは92%以上である。マレイミド基導入率は以下に記載の試験法において測定を行うことができる。

マレイミド基導入率の測定法：400MHz  $^1\text{H-NMR}$ にて測定を行う（測定装置：ECP400、日本電子（株）製）。試料15~20mgを重クロロホルム0.55mLに溶解し、 $^1\text{H-NMR}$ を測定する。得られたNMRチャートにおいて、マレイミド基由来のピーク（ $\delta$ 6.69、s）、中間原料（ポリオキシアルキレン末端マレイアミド酸）由来ピーク（ $\delta$ 6.35、dd）および反応中間体由来ピーク（ $\delta$ 7.22および6.62、d）の積分値を求め、各積分値の総和に対するマレ

イミド基由来のピーク面積の百分率を計算し、ポリオキシアルキレン鎖末端官能基のマレイミド基導入率を算出する。また、通常、生体関連物質との反応は緩衝液中で行われる。そのため、ポリオキシアルキレン誘導体については、緩衝液中での加水分解安定性の優れたものが要求されている。加水分解安定性が低い場合には、緩衝液中での反応において加水分解を起こし、生体関連物質の修飾率が低下し、その修飾効果が十分得られない、また、十分な修飾効果を得るためには大過剰量のポリオキシアルキレン誘導体が必要になってくる、といった問題がある。本発明で得られる生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体は、pH 7、23℃での加水分解安定性試験において、マレイミド基導入率の半減期（50%減衰時間）が48時間以上であり、好ましくは54時間以上であり、より好ましくは60時間以上である。また、25%減衰時間が24時間以上、70%減衰時間が67時間以上であることが好ましく、より好ましくは25%減衰時間が27時間以上、70%減衰時間が75時間以上である。

【0030】加水分解安定性試験は以下に記載の試験法において測定を行うことができる。

加水分解安定性試験：試料0.02gを50mLスクリーン管に採取し、20mLのpH 7に調整した50mMリン酸緩衝液で溶解する。溶解後、23℃で24、48、72時間後にそれぞれ4mLずつとり、1%リン酸水溶液を数滴加えた後、凍結乾燥を行う。これをクロロ

ホルムに溶解し不溶物を濾別し、エバポレーターで濃縮して得られたものについて<sup>1</sup>H-NMRを測定してマレイミド基導入率を算出する。得られた各時間におけるマレイミド基導入率の初期マレイミド基導入率に対する下記の変化率を算出する。

変化率＝[(各時間におけるマレイミド基導入率) / (初期のマレイミド基導入率)] × 100

変化率が75%になった時間を25%減衰時間、50%になった時間を50%減衰時間（半減期）、30%になった時間を70%減衰時間とする。25%減衰時間、50%減衰時間（半減期）および70%減衰時間は、24、48、72時間後の変化率を測定し、横軸を時間、縦軸を変化率としたグラフを作成し、切片を100として最小二乗法により得られた直線式を用いて、それぞれ75%、50%および30%になる時間を算出することにより求められる。

【0031】本発明で得られる生体関連物質の修飾に用いられるポリオキシアルキレン誘導体は以下に示す製造工程によって得られる。式(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体から製造を行うことができる。好ましくは、純度の点で式(2)で示される末端水酸基含有ポリオキシアルキレン誘導体から製造することが良好である。

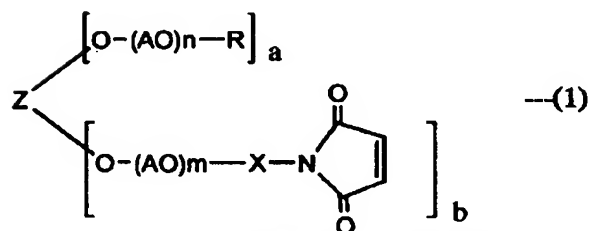
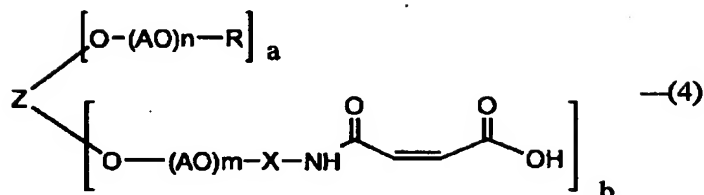
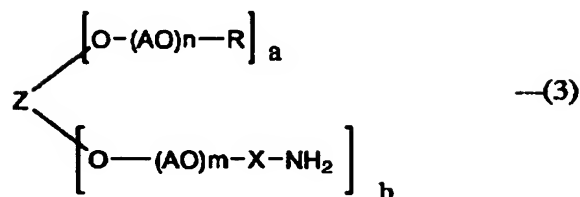
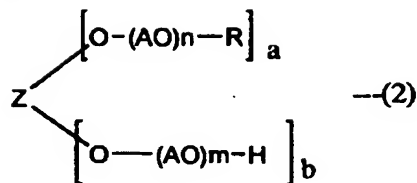
【0032】

【化17】



13

14



【0033】工程[A]は式(2)で示される末端水酸基含有ポリオキシアルキレン誘導体に対しアルカリ触媒存在下においてアクリロニトリル、ニトリル基を有する炭素数3～10である2価の炭化水素のハロゲン化物などを付加してシアノ化を行い、その後、水素添加を行う工程であり、ポリオキシアルキレン鎖と末端アミノ基との間に炭素数3～10の2価の炭化水素基をもつ式

(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体を得られる。ここで、ニトリル基を有する炭素数3～10である2価の炭化水素のハロゲン化物として、臭化物、塩化物、ヨウ化物が好ましく、より好ましくは塩化物、臭化物である。式(2)で示される化合物をシアノ化するには水や式(2)で示される化合物を溶解する有機溶媒を用いることが好ましく、式(2)で示される化合物を溶解する有機溶媒としてはクロロホルム、トルエン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド

などが好ましく、さらに好ましくはトルエン、アセトニトリルである。溶媒使用量は式(2)で示される化合物に対し50～500容量/重量%であり、好ましくは70～300容量/重量%である。アルカリ触媒は水酸化カリウム、水酸化ナトリウムなどの強アルカリ金属の水酸化物、ナトリウムメチラートなどの強アルカリアルコールを用いる。触媒の使用量は式(2)で示される化合物に対し0.5～25重量%であり、好ましくは3～10重量%である。アクリロニトリルなどのシアノ化剤の量は式(2)で示される化合物の水酸基1当量に対し1～100当量が好ましく、より好ましくは10～60当量である。反応温度は-20℃～150℃が好ましく、より好ましくは0℃～100℃である。反応時間は1～10時間が好ましく、より好ましくは2～6時間である。反応後、水洗や吸着処理により触媒を除去し、溶剤を除去してポリオキシアルキレンシアノ化物が得られ

40

50

る。

【0034】得られたポリオキシアルキレンシアノ化物は水素化に通常用いられる触媒を用いて水素化を行い、式(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体とする。この工程において、ポリオキシアルキレンシアノ化物はこれを溶解する有機溶媒に溶解するのが好ましく、トルエンまたはエタノールが好ましく、より好ましくはトルエンである。溶媒使用量はポリオキシアルキレンシアノ化物に対し50～500容量/重量%であり、好ましくは70～300容量/重量%である。触媒としては、ニッケルまたはコバルトが好ましく、より好ましくはニッケルである。触媒量はポリオキシアルキレンシアノ化物に対し0.5～25重量%が好ましく、より好ましくは1～10重量%である。ニッケル触媒を用いる場合は水素化反応時の副反応を防ぐためにアンモニアガスを添加することが好ましい。アンモニアガスの添加量はポリオキシアルキレンシアノ化物に対し5～30重量%であり、より好ましくは10～20重量%である。水素圧は1～10MPaが好ましく、より好ましくは3～6MPaである。反応温度は80～200℃が好ましく、より好ましくは100～150℃である。反応時間は0.5～10時間が好ましく、より好ましくは1～5時間である。反応後、ろ過により触媒を除去し、溶剤を除去して式(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体を得られる。この工程において、得られたポリオキシアルキレンシアノ化物および式(3)で示される化合物は晶析、吸着処理などによる精製工程を行ってもよい。

【0035】工程[B]は工程[A]で得られた式

(3)で示される化合物と無水マレイン酸を反応させることにより、式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレアミド酸を得る工程である。式(3)で示される末端アミノ基含有ポリオキシアルキレン誘導体のアミン純度は90%以上が好ましく、より好ましくは95%以上である。アミン純度が低い場合、工程[C]における閉環反応が起こらないため、式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体の末端官能基のマレイミド基導入率が低くなってしまう。アミン純度は以下に記載の試験法において測定を行うことができる。アミン純度の測定法：液体クロマトグラフィにて測定を行う。カラムは東ソー TSK gel SP-5PW (7.5mm I.D.×7.5cm、東ソー(株)製)を使用し、溶離液は2mMリン酸緩衝液(pH6.5)、流速0.5mL/分、カラム温度40℃、検出器に示差屈折計を用い、試料は0.5重量%濃度の2mMリン酸緩衝液(pH6.5)溶液とし、注入量は20μLとする。得られたクロマトグラムにおいて、ピークが分離している場合はピーク間の極小値から垂直分割し、ピークが重なっている場合はピーク間の変曲点から垂直分割して、得られた各ピークの面積値からメインピークの面積百分率を算出す

る。式(3)で示される化合物はこれを溶解する有機溶媒に溶解するのが好ましく、クロロホルムまたはトルエンが好ましい。溶媒使用量は式(3)で示される化合物に対し50～500容量/重量%であり、好ましくは70～300容量/重量%である。無水マレイン酸量は(3)で示される化合物のアミノ基1当量に対し1.0～2.0当量が好ましく、より好ましくは5～15当量である。反応温度は20～80℃が好ましく、より好ましくは40～60℃である。反応時間は0.5～10時間が好ましく、より好ましくは1～5時間である。得られた式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレアミド酸はこれを溶解する有機溶剤に溶解し、酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物を用いて晶析を行う。式(4)で示される化合物を溶解する有機溶剤としてはクロロホルム、トルエン、アセトニトリルまたはジメチルホルムアミドが好ましく、より好ましくはクロロホルムまたはトルエンである。有機溶剤量は式(4)で示される化合物に対して50～500容量/重量%の範囲であり、好ましくは70～300容量/重量%の範囲である。

【0036】酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物の溶剤量はポリオキシアルキレン末端マレアミド酸に対し300～5000容量/重量%であり、好ましくは500～2000容量/重量%である。酢酸エチルとn-ヘキサンの混合比は容量比で1:9～9:1であり、好ましくは4:6～6:4である。晶析工程において、式(4)で示される化合物を溶解する有機溶剤で溶解する際の温度は0～80℃が好ましく、より好ましくは20～40℃である。この溶液に対して酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物を加え、結晶を析出させる際の温度は20～35℃が好ましい。酢酸エチルとn-ヘキサンは別々に加えてもよい。晶析は2回以上繰り返行っても良い。また、得られた式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレアミド酸に含まれる無水マレイン酸の含有量は0.5重量%以下であり、好ましくは0.1重量%以下である。式(4)で示される化合物に含まれる無水マレイン酸の含有量が多いと目的の化合物より高分子量の不純物が生成し、GPC純度が低下する問題が生じる。

【0037】無水マレイン酸の含有量は以下に記載の方法で測定することができる。

ポリオキシアルキレン末端マレアミド酸に含まれる無水マレイン酸の含有量の測定法：試料15～20mgを重クロロホルム0.55mLに溶解し、400MHz<sup>1</sup>H-NMR(測定装置：ECP400、日本電子(株)製)にて測定を行う。得られたNMRチャートにおいて、基準となるピーク(例えばメトキシ基を基準とした場合、δ3.38、s、3H)に対して無水マレイン酸由来のピーク(δ7.05、s、2H)の積分値を求め、以下の式から無水マレイン酸の含有量を算出する。無水マレイン酸含有量[重量%] = (積分値/2) × 98/ポリオキシアルキレン末端マレアミド酸の分子

量) × 100

【0038】工程[C]は工程[B]で得られた式

(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレイミド酸を閉環し、式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体を得る工程である。閉環反応は、式(4)で示されるポリオキシアルキレン末端マレイミド酸に対し5~1000重量%、好ましくは100~500重量%の無水酢酸を加えて溶解し、1~50重量%、好ましくは5~40重量%の酢酸ナトリウムやトリエチルアミンなどの触媒を加え、60~130℃に加温することにより行われる。必要ならば、有機溶剤を用いてもよい。用いる有機溶媒としてはクロロホルム、アセトニトリル、トルエンが好ましく、式(4)の化合物に対し、50~500容量/重量%の範囲であり、好ましくは70~300容量/重量%の範囲である。反応後、触媒をろ過により除去、減圧下、60~130℃で濾液を濃縮する。濃縮物を有機溶剤に溶解した後、n-ヘキサンと酢酸エチルの混合物を加えて結晶を析出させ、ろ過後、乾燥し、式(1)で示されるポリオキシアルキレン誘導体を得ることができる。有機溶剤としてはクロロホルムまたはトルエンが好ましく、有機溶剤量は式(1)の化合物に対して50~500容量/重量%の範囲であり、好ましくは70~300容量/重量%の範囲である。酢酸エチルとn-ヘキサンの混合物の溶剤量は式(1)の化合物に対して300~5000容量/重量%であり、好ましくは500~2000容量/重量%である。酢酸エチルとn-ヘキサンの混合比は容量比で1:9~9:1であり、好ましくは4:6~6:4である。酢酸エチルとn-ヘキサンは別々に加えてもよく、精製は繰り返し行っても良い。

【0039】本発明のポリオキシアルキレン誘導体を用いて生体関連物質を修飾する方法は、例えば、生体関連物質をリン酸緩衝液に溶解し、10℃以下に冷却した後、ポリオキシアルキレン末端マレイミド誘導体を加え、1~10時間攪拌する。脱塩後、凍結乾燥してポリオキシアルキレン誘導体で修飾した生体関連物質が得られる。

【0040】

【発明の効果】本発明のポリオキシアルキレン誘導体は、高純度であり、マレイミド基部分が保存安定性に優れているため、生体関連物質の修飾を行っても安定性に優れている。また、本発明の製造方法で製造することにより、安全に高純度のものが容易に得られる。本発明のポリオキシアルキレン誘導体を用いて修飾した生体関連物質は、安定性に優れており、有用である。

【0041】

【実施例】以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明する。

実施例1

シアノ化反応：メトキシポリオキシエチレン（分子量 50

000、式(2)において $n+m=112$ 、 $a=1$ 、 $b=1$ である化合物、MEH-50H 日本油脂(株)製) 640gを攪拌機、滴下装置、温度計および窒素パブリングラインのついた3L四つ口フラスコに仕込み、イオン交換水640gを加えて溶解し、10℃以下まで冷却した。これに50%水酸化カリウム40gを加え、さらに5℃以下に冷却した後、5℃以下に保ったまま、アクリロニトリル340gを2時間かけて滴下し、さらに2時間攪拌した。反応終了後、85%リン酸24gを加えて中和した。この反応液842gにイオン交換水2800gに塩化ナトリウム500gを溶かした水溶液を加え、クロロホルム1000mLで抽出した。クロロホルム層を分層後、水層にクロロホルム500mLを加えて抽出した。このクロロホルム液を濾過した後、90℃、0.3kPaの減圧下で脱溶剤を行い、固化して粗メトキシポリオキシエチレンシアノエチル化物640gを得た。粗メトキシポリオキシエチレンシアノエチル化物600gを攪拌機および窒素シールラインのついた10Lビーカーに仕込み、クロロホルム500mLに溶解した後、酢酸エチル4Lとヘキサン4Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して結晶を得た後、さらにクロロホルム400mLに溶解して、さらに酢酸エチル4Lとヘキサン4Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得られた結晶を乾燥してメトキシポリオキシエチレンシアノエチル化物540gを得た。

アミノ化反応：メトキシポリオキシエチレンシアノエチル化物200g、トルエン400g、ニッケル触媒4gを攪拌機、温度計、窒素導入管、水素導入管およびアンモニア導入管のついた1Lオートクレーブに仕込み、反応容器内を窒素置換した。60℃まで昇温して溶解した後、アンモニアガスを30g吹き込み、さらに水素ガスを4MPaまで吹き込んだ。反応容器を130℃まで昇温して3時間攪拌しながら反応した。反応容器を80℃まで冷却してから触媒を濾別し、90℃、0.3kPaの減圧下、1時間で脱溶剤を行い、固化してメトキシポリオキシエチレンプロピルアミン170gを得た。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルアミンのアミン純度は95.2%であった。

マレイミド化反応：メトキシポリオキシエチレンプロピルアミン164g、トルエン325mLを攪拌機、温度計、冷却管および窒素パブリングラインのついた1L四つ口フラスコに仕込み、50℃に加温して溶解した。これに無水マレイン酸32gを加え、4時間攪拌して反応した。反応液を40℃まで冷却後、酢酸エチル800mLとヘキサン800mLの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得た結晶を再度トルエン325mLに溶解し、酢酸エチル800mLとヘキサン800mLの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させ、濾過して結晶を得た。この結晶を乾燥してメトキ

シポリオキシエチレンプロピルマレアミド酸167gを得た。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルマレアミド酸に含まれる無水マレイン酸の含有量は0.0011重量%であった。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルマレアミド酸167g、無水酢酸500mL、酢酸ナトリウム64gを攪拌機、温度計、冷却管および窒素バブリングラインのついた1L四つ口フラスコに仕込み、90℃まで加温した。90℃で3時間攪拌して反応を行った後、50℃まで冷却し酢酸ナトリウムを濾過し、90℃、0.3kPaの減圧下で濾液を濃縮した。クロロホルム330mLに溶解して不溶物を濾過した後、酢酸エチル1Lとヘキサン1Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して結晶を得た後、さらにクロロホルム330mLに溶解して、さらに酢酸エチル1Lとヘキサン1Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得られた結晶を乾燥してメトキシポリオキシエチレンプロピルマレイミド160gを得た。得られた結晶は薄桃色であった。

#### 【0042】実施例2

シアノ化反応：ポリオキシエチレン（分子量1000、式(2)において $m=113$ 、 $a=0$ 、 $b=2$ である化合物、PEG11000 日本油脂(株)製)1600gを攪拌機、滴下装置、温度計および窒素バブリングラインのついた5L四つ口フラスコに仕込み、イオン交換水1600gを加えて溶解し、10℃以下まで冷却した。これに50%水酸化カリウム100gを加え、さらに5℃以下に冷却した後、5℃以下まで冷却した。5℃以下に保ったまま、アクリロニトリル850gを2時間かけて滴下し、さらに2時間攪拌した。反応終了後、85%リン酸60gを加えて中和した。クロロホルム2500mLおよび1250mL、イオン交換水7000g、塩化ナトリウム1250gを使用し、以下は実施例1と同様に操作を行い、粗ポリオキシエチレンジシアノエチル化物1600gを得た。粗ポリオキシエチレンジシアノエチル化物1600gを攪拌機および窒素シールラインのついた30Lピーカーに仕込み、クロロホルム1.4Lに溶解した後、酢酸エチル11.1Lとヘキサン11.1Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して結晶を得た後、さらにクロロホルム1.4Lに溶解して、さらに酢酸エチル11.1Lとヘキサン11.1Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得られた結晶を乾燥してポリオキシエチレンジシアノエチル化物1400gを得た。

アミノ化反応：ポリオキシエチレンジシアノエチル化物200g、トルエン400g、ニッケル触媒9gを攪拌機、温度計、窒素導入管、水素導入管およびアンモニア導入管のついた1Lオートクレーブに仕込んだ。その後は実施例1と同様に操作を行い、ポリオキシエチレンジプロピルアミン170gを得た。得られたポリオキシエチレンジプロピルアミンのアミン純度は93.7%であ

った。

マレイミド化反応：ポリオキシエチレンジプロピルアミン164g、トルエン325mLを攪拌機、温度計、冷却管および窒素バブリングラインのついた1L四つ口フラスコに仕込み、50℃に加温して溶解した。これに無水マレイン酸32gを加え、4時間攪拌して反応した。反応液を40℃まで冷却後、酢酸エチル800mLとヘキサン800mLの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得た結晶を再度トルエン325mLに溶解し、酢酸エチル800mLとヘキサン800mLの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させ、濾過して結晶を得た。この結晶を乾燥してポリオキシエチレンジプロピルマレアミド酸165gを得た。得られたポリオキシエチレンジプロピルマレアミド酸に含まれる無水マレイン酸の含有量は0.0018重量%であった。得られたポリオキシエチレンジプロピルマレアミド酸165g、無水酢酸500mL、酢酸ナトリウム63gを攪拌機、温度計、冷却管および窒素バブリングラインのついた1L四つ口フラスコに仕込み、90℃まで加温した。90℃で3時間攪拌して反応を行った後、50℃まで冷却し酢酸ナトリウムを濾過し、90℃、0.3kPaの減圧下で濾液を濃縮した。クロロホルム360mLに溶解して不溶物を濾過した後、酢酸エチル1Lとヘキサン1Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して結晶を得た後、さらにクロロホルム360mLに溶解して、さらに酢酸エチル1Lとヘキサン1Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得られた結晶を乾燥してポリオキシエチレンジプロピルマレイミド160gを得た。得られた結晶は薄桃色であった。

#### 【0043】実施例3

シアノ化反応：テトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールエーテル（分子量10000、式(2)において $m=56$ 、 $a=0$ 、 $b=4$ である化合物、DGE-10000日本油脂(株)製)1600gを攪拌機、滴下装置、温度計および窒素バブリングラインのついた5L四つ口フラスコに仕込み、イオン交換水1600gを加えて溶解し、10℃以下まで冷却した。これに50%水酸化カリウム100gを加え、さらに5℃以下に冷却した。5℃以下に保ったまま、アクリロニトリル850gを2時間かけて滴下し、さらに2時間攪拌した。反応終了後、85%リン酸60gを加えて中和した。クロロホルム2500mLおよび1250mL、イオン交換水7000g、塩化ナトリウム1250gを使用し、以下は実施例1と同様に操作を行い、粗テトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラシアノエチル化物1600gを得た。粗テトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラシアノエチル化物1600gを攪拌機および窒素シールラインのついた30Lピーカーに仕込み、クロロホルム1.4Lに溶解した後、酢酸エチル11.

1 Lとヘキサン11.1 Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して結晶を得た後、さらにクロロホルム1.4 Lに溶解して、さらに酢酸エチル11.1 Lとヘキサン11.1 Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得られた結晶を乾燥してテトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラシアノエチル化物1400 gを得た。

アミノ化反応：テトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラシアノエチル化物200 g、トルエン400 g、ニッケル触媒9 gを攪拌機、温度計、窒素導入管、水素導入管およびアンモニア導入管のついた1 Lオートクレーブに仕込み、後は実施例1と同様に操作を行い、テトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルアミン170 gを得た。得られたテトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルアミンのアミン純度は93.1%であった。

マレイミド化反応：テトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルアミン164 g、トルエン325 mLを攪拌機、温度計、冷却管および窒素パブリングラインのついた1 L四つ口フラスコに仕込み、50℃に加熱して溶解した。これに無水マレイン酸64 gを加え、4時間攪拌して反応した。反応液を40℃まで冷却後、酢酸エチル800 mLとヘキサン800 mLの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得た結晶を再度トルエン325 mLに溶解し、酢酸エチル800 mLとヘキサン800 mLの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させ、濾過して結晶を得た。この結晶を乾燥してテトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルマレアミド酸167 gを得た。

得られたテトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルマレアミド酸に含まれる無水マレイン酸の含有量は0.025重量%であった。得られたテトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルマレアミド酸167 g、無水酢酸500 mL、酢酸ナトリウム63 gを攪拌機、温度計、冷却管および窒素パブリングラインのついた1 L四つ口フラスコに仕込み、90℃まで加熱した。90℃で3時間攪拌して反応を行った後、50℃まで冷却し酢酸ナトリウムを濾過し、90℃、0.3 kPaの減圧下で濾液を濃縮した。クロロホルム360 mLに溶解して不溶物を濾過した後、酢酸エチル1 Lとヘキサン1 Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して結晶を得た後、さらにクロロホルム360 mLに溶解して、さらに酢酸エチル1 Lとヘキサン1 Lの混合液を注ぎ、30分攪拌して結晶を析出させた。濾過して得られた結晶を乾燥してテトラ（ポリオキシエチレン）ジグリセロールテトラプロピルマレイミド162 gを得た。得られた結晶は薄桃色であった。

#### 【0044】比較例1

メトキシポリオキシエチレンプロピルアミン（分子量5

000）を原料として、先行文献（Synthetic communications, 22(16), 2425-29(1992)）記載の方法により、メトキシポリオキシエチレンエチルマレイミドの合成を行った。シアノ化、アミノ化においては、実施例1と同一原料、同一方法で行い、メトキシポリオキシエチレンプロピルアミンを得た。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルアミンのアミン純度は96.8%であった。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルアミン2.5 g、無水マレイン酸460 mgおよびジオキサン10 mLを50 mLフラスコに仕込み、80℃で30分攪拌して反応した。反応液を冷却後、エーテル500 mLを注ぎ、一晚放置して結晶を析出させた。析出した結晶を濾過し、結晶をエーテルで洗浄した後、真空下で乾燥してメトキシポリオキシエチレンプロピルマレアミド酸を得た。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルマレアミド酸に含まれる無水マレイン酸の含有量は0.086重量%であった。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルマレアミド酸に対し、無水酢酸20 mL、酢酸ナトリウム1.0 gを50 mLフラスコに仕込み、100℃で45分攪拌して反応を行った。冷却後、エバポレーションで溶剤を除き、50 mLのジクロロメタンに溶解し、活性炭で吸着処理を行った。これを濾過し、エーテル500 mLを注ぎ、一晚放置して結晶を析出させた。析出した結晶を濾過し、結晶をエーテルで洗浄した後、真空下で乾燥してメトキシポリオキシエチレンプロピルマレイミド2.2 gを得た。得られた結晶は薄桃色であった。

#### 【0045】比較例2

シアノ化、アミノ化においては、実施例1と同一原料、同一方法で行い、メトキシポリオキシエチレンプロピルアミンを得た。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルアミンのアミン純度は98.8%であった。得られたメトキシポリオキシエチレンプロピルアミン164 g、トルエン325 mLを攪拌機、温度計、冷却管および窒素パブリングラインのついた1 L四つ口フラスコに仕込み、50℃に加熱して溶解した。これに無水マレイン酸32 gを加え、4時間攪拌して反応した。反応終了後、サンプリングを行ったところ、無水マレイン酸の含有量は15重量%であった。無水酢酸500 mL、酢酸ナトリウム64 gを仕込み、90℃まで加熱した。以下、実施例1と同様の操作を行い、メトキシポリオキシエチレンプロピルマレイミド164 gを得た。得られた結晶は濃茶色であった。

#### 比較例3

比較例3としてメトキシポリエチレングリコールマレイミド（分子量5000、Fluka社製、Product Number 63187 [Methoxypolyethylene glycol 5,000 mleiimide]）を用いた。

【0046】実施例1～3および比較例1～3で得られたポリオキシアルキレン誘導体について、GPC純度およびマレイミド基導入率について比較した。結果を表1\*

\*に示す。

【0047】

【表1】

表 1

	GPC純度 [%]	マレイミド基導 入率 [%]	無水マレイン酸 の含有量(重量%)
実施例 1	97.7	95.7	0.0011
実施例 2	94.4	93.1	0.0018
実施例 3	92.8	92.2	0.025
比較例 1	99.2	84.7	0.086
比較例 2	51.6	94.3	15
比較例 3	98.4	78.0	—

【0048】本発明の製造方法で得られたポリオキシアルキレン誘導体は、GPC純度、マレイミド基導入率とも高純度であるのに対して、本発明の範囲外である比較例はGPC純度、マレイミド基導入率ともに本発明の要求を満足するものは得られなかった。

【0049】実施例1および比較例3で得られたポリオキシアルキレン誘導体について、加水分解安定性について比較した。結果を表2に示す。試験方法は次の通りである。

加水分解安定性試験

試料0.1gを50mLスクリー管に採取し、100※

※mLのpH7に調整した50mMリン酸緩衝液で溶解する。溶解後、23℃で24時間、48時間、72時間後にそれぞれ4mLとり、1%リン酸水溶液を数滴加えた後、凍結乾燥を行った。これをクロロホルムに溶解し不溶物を濾別し、エバポレーターで濃縮して得られたものについて<sup>1</sup>H-NMRを測定してマレイミド基導入率を算出した。初期マレイミド基導入率に対する変化率を表2に示す。

【0050】

【表2】

表 2

	24時間後 [%]	48時間後 [%]	72時間後 [%]
実施例 1	81.8	63.2	47.4
比較例 3	73.4	42.7	26.0

【0051】これらの測定結果から得られた50%減衰時間(半減期)は実施例1が67時間、比較例3が46時間であり、25%減衰時間については、それぞれ33時間、23時間、70%減衰時間については、それぞれ94時間、64時間であった。また、実施例1および比較例3のポリオキシアルキレン誘導体により修飾したリゾチームの安定性について比較した。結果を表3に示す。試験方法は次の通りである。

リゾチームのチオール化

ニワトリ卵白リゾチームをpH7.4のリン酸緩衝液に溶解して0.5mMとし、4℃に冷却しながらリゾチームに対し2.5倍モル量の2-イミノチオラン塩酸塩(Aldrich Chemical Co.)を加えて一晩攪拌し、リジン残基の側鎖アミノ基をチオール化した。これに2倍モル過剰の実施例1および比較例3で得られたポリオキシアルキレン末端マレイミド誘導体を加え、冷却しながら3時間反応させた。無機塩を除去後、凍結乾燥してポリオキシアルキレン誘導体により修

飾したリゾチームを得た。

【0052】修飾リゾチームの安定性試験

修飾リゾチーム0.1gをpH7.0の10mMリン酸緩衝液(4-ヒドロキシ安息香酸メチル0.1%)20mLに溶解し、40℃で所定時間保持して修飾リゾチームの活性を測定した。修飾リゾチームの活性測定法は以下の通りである。マイクロコッカス・リソディクチクス(MLyso de i k t i c s)の乾燥菌体を適量とり、75mMリン酸ナトリウム(pH6.2)を加えて振り混ぜ、75mMリン酸ナトリウムを対照として波長640nmの吸光度が1.00になるように調整し、基質溶液とした。また、リゾチーム量が5~15μg/gになるように精製水で調整し、試料溶液とした。37℃に保った基質溶液3.0mLに対し試料溶液を0.1mL加え、攪拌した後、75mMリン酸ナトリウムを対照として波長640nmの吸光度を測定した。

【0053】

【表3】

表 3

	1 ヲ月 後 [%]	2 ヲ月 後 [%]	3 ヲ月 後 [%]	4 ヲ月 後 [%]
実施例 1	9 8	9 1	8 5	7 8
比較例 3	8 0	6 4	4 6	3 1

【0054】上記の結果から、ポリオキシアルキレン鎖とマレイミド基の間に炭素数2のアルキル基をもつ比較例3のポリオキシアルキレン誘導体は、実施例と比較し 10

て化合物単体での安定性、酵素修飾を行った後の酵素の活性も著しく劣ることがわかる。